

⑨ 日本国特許庁 (JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭55—34039

⑪ Int. Cl.³

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和55年(1980)3月10日

C 12 N 9/16

7349—4 B

// C 12 R 1/07

発明の数 1

審査請求 有

(全 5 頁)

⑭ バチルス・スリンギエンシス菌 (Bacillus thuringiensis) のホスファチジルイノシトールホスホリパーゼ C の製造法

名古屋市瑞穂区下山町 2 丁目 44 番地の 6

⑮ 出 願 人 池澤宏郎

名古屋市瑞穂区下山町 2 丁目 44 番地の 6

⑯ 特 願 昭53—105875

⑰ 出 願 昭53(1978)8月30日

⑱ 代 理 人 弁理士 三宅宏

⑲ 発 明 者 池澤宏郎

明 細 書

1 発明の名称

バチルス・スリンギエンシス菌 (Bacillus thuringiensis) のホスファチジルイノシトールホスホリパーゼ C の製造法

とミオイノシトールリン酸モノエステル類を生成する酵素である。この場合、生成するミオイノシトールリン酸モノエステル類とは、ミオイノシトール-1-リン酸とミオイノシトール-1、2、-環状リン酸の混合物である。

2 特許請求の範囲

バチルス・スリンギエンシス菌 (Bacillus thuringiensis) に属する菌株を^{培地に}培養し、培養物からホスファチジルイノシトールホスホリパーゼ C を採取することを特徴とする製造法。

本酵素は動物細胞にも広範囲に見出されるが精製された例は見られず、細菌ではセレウス菌 [Biochimica et Biophysica Acta)、第 450 巻、第 2 号、154 頁、1976 年]、ブドウ球菌 [バイオケミカル・ジャーナル (Biochemical Journal)、第 162 巻、第 2 号、285 頁、1977 年]、ノービ菌 [アーカイブズ・オブ・バイオケミストリー・アンド・バイオフィジックス (Archives of Biochemistry and Biophysics)、第 186 巻、第 1 号、196 頁、1978 年] の酵素で精製例があるが、収率が良くない。これらの細菌性ホスファチジルイノシトールホスホリパーゼ C は試験内で動物細胞膜に作用して、アルカリ性ホスファターゼ

3 発明の詳細を説明

本発明は、バチルス属に属する細菌であるバチルス・スリンギエンシス菌 (Bacillus thuringiensis) によるホスファチジルイノシトールホスホリパーゼ C の製造法に関する。

ホスファチジルイノシトールホスホリパーゼ C は、リン脂質分解酵素の一種で、ホスファチジルイノシトールを加水分解してジグリセリド

を遊離する作用があることが知られている。
セレウス菌、ノービ菌の酵素の場合、このホスファターゼ遊離作用が同じ菌の他のリン脂質分解酵素であるホスファチジルコリン分解型、スフィンゴミエリン分解型のホスホリパーゼCの作用によるものではないことが判明している。

従来、精製が行なわれて来た細菌では、培地中に本酵素が少量しか生産されず、その上、ホスファチジルコリン、スフィンゴミエリンなど他のリン脂質を分解する酵素が相当量培地中に産出され、明らかに精製に不便なため、収率が良くなかった。本発明では、バチルス・スリングエンシス菌(*Bacillus thuringiensis*)を通常の栄養培地で培養し、他の菌より高い収率でホスファチジリンシトールホスホリパーゼCを得、しかも培地中にはホスファチジルコリン分解型、スフィンゴミエリン分解型ホスホリパーゼCの生産が全く見られないか、あるいは微量しか生産されなかつた。このように培養して得た培養物から硫酸塩析、イオン交換剤、

ゲル濾過剤で分離精製し、ホスファチジリンシトールホスホリパーゼCを高収量に採取したのが、本発明の特徴である。このようにして製造されたホスファチジリンシトールホスホリパーゼCは、アルカリ性ホスファターゼ遊離作用を示すほか、全く新しい知見としてマウス腹水ガンであるザルコーマ180(*Sarcoma 180*)に対する顕著な抗腫瘍性を示すことが判明した。

本発明で使用する菌株は、バチルス・スリングエンシス菌(*Bacillus thuringiensis*)の菌株でホスファチジリンシトールホスホリパーゼCを生産する能力を有する菌株であれば、何れの菌株でも良く、またこれらの変種もしくは変異株でも良いが、例えば、バチルス・スリングエンシスIAM11607、バチルス・スリングエンシスIAM12077、バチルス・スリングエンシスIAM12078、バチルス・スリングエンシス・バリエタス・スリングエンシスIAM11056などが好適なものとして挙げられる。培地は天然の栄養培地で十分

であり、例えばポリペプトン、酵母エキス、食塩、リン酸二ナトリウムなどを含む培地が使用される。また、培養物から酵素を精製するのに使用するイオン交換剤は、イオン交換セルローズ、イオン交換セファデックスのどちらでも良く、ゲル濾過剤としてはセファデックスG-75、セファデックスG-100のどちらも使用可能であるが、例えばCM-セファデックスとセファデックスG-75の組合せを用いると収率よく得られた。

以下に実施例により、本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

実施例1

1. 培養、NaCl 0.5%、 Na_2HPO_4 0.04%、酵母エキス1%、ポリペプトン1%の組成から成る培地(PH 6.0)40ℓを関東理化学製作所製のジャーファーマンター中に入れ、120℃、20分殺菌後、バチルス・スリングエンシスIAM11607菌の種培養を容重比で2.5%に

なるように加えて接種後、37℃で通気量10ℓ/minで培養し、7時間(対数期の後期)で培養を終了する。

2. 精製

上記1で得た培養液を12000rpmで遠心分離(連続遠心)して菌体を除去し、上清を集めて硫酸アンモニウム80%飽和とし、沈澱物をPH 5.2の0.01mol/ℓ酢酸緩衝液に溶解し、同緩衝液で一夜4℃で、セロハン・チューブを透析膜として8回透析する。透析チューブ内液を、PH 5.2の0.01mol/ℓ酢酸緩衝液で平衡にしたCM-セファデックスC-50(陽イオン交換セファデックスの一種の商標名; Pharmacia Fine Chemicals Inc., U.S.A.)のカラムにチャージする(カラムサイズ; 60×400)。カラムは最初同じ緩衝液約8ℓ、次いで0.01mol/ℓ NaClを含む同じ緩衝液2.4ℓ、さらに0.2mol/ℓ NaClを含む同じ緩衝液8.6ℓで順次溶出する。ホスファチジリンシトールホスホリパーゼCは最後の0.2

mol/l の NaCl を含む緩衝液での溶出面分 (フラクション No. 475-540) に得られた。カラムの溶出速度は 100 ml/hr で 1 フラクションの液量は 15ml である。

このようにして得られたホスファチジルイノシトールホスホリパーゼ C の溶出面分を集め、ダイアフロメンブラン UM-10 (アミコンファーマーイストリミット社製、商標) で濃縮し、次いで PH 7.5 の 0.01 mol/l トリス塩酸緩衝液で一夜 4℃ で、セロハンチューブを透析膜として透析する。この透析操作を 8 回繰り返した後、透析チューブ内液を同じ緩衝液で平衡にしたセファデックス G-75 (デキストラン誘導体より成る分子篩の商標名; Pharmacia Fine Chemicals Inc., U. S. A.) のカラムにチャージし (カラムサイズ: 2.6 cm × 100 cm)、同じ緩衝液で溶出した。ホスファチジルイノシトールホスホリパーゼ C は、フラクション No. 80-120 (1 フラクションの液量は 8 ml) の面分に得られた。カラムの溶出速度は 20

ml/hr である。

このようにして得られたホスファチジルイノシトールホスホリパーゼ C の面分を集め、ダイアフロメンブラン UM-10 (アミコンファーマーイストリミット社製、商標) で濃縮し、第 1 表に示すごとく 22.1% の高収率でホスファチジルイノシトールホスホリパーゼ C の酵素標品を得た。第 1 表では、精製の各段階の蛋白量およびホスファチジルイノシトールホスホリパーゼ C の活性を示したが、活性の測定は公知 (Biochimica et Biophysica Acta) 第 450 巻、第 2 号、154 頁、1976 年) の方法に従って行なった。

第 1 表

精製段階	総蛋白質 (mg)	全活性 (units)	比活性 (units/mg)	収 量 (パーセント)
硫酸沈澱	720	648	0.9	100
CM-セファデックス C-50	21	489	21.0	67.7
セファデックス G-75	2.1	148	68.1	22.1

3. 諸性質

精製された酵素の蛋白質としての性質をしらべると、等電点 5.4、分子量は 28000 であつた。等電点の測定はキャリアアンホライトによる等電点分画法、分子量の測定はセファデックス G-75 によるゲル濾過法を用いた。酵素はホスファチジルイノシトールに特異的に作用し、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、スフィンゴミエリンなど

の他のリン脂質に作用しなかつた。また、ラット腎の切片に作用させると、アルカリ性ホスファターゼ遊離活性を示した。

従来、知られていなかった全く新しい知見として、精製された本酵素ホスファチジルイノシトールホスホリパーゼ C が、マウス腹腔内に移植した腹水ガン細胞ザルコーマ 180 (Sarcoma 180) に対して顕著な発育抑制作用を示すことが、動物実験の結果、明らかとなつた。この発育抑制効果に関する実験は TVPC 法の変法によつて行なつた。すなわち、体重 21-25g の 5 週令 ICR マウスの腹腔に、6000000 箇のザルコーマ 180 の細胞を含有する浮遊液 0.05 ml を接種した後、24 時間ごとに 5 回、精製ホスファチジルイノシトールホスホリパーゼ C 溶液 0.1 ml を腹腔内に注射した。ザルコーマ 180 接種の 7 日後に腹水を取り、8000 rpm で 10 分遠心分離し、沈積した細胞の重量を測定した。投与する酵素の用量は 10 倍間隔で 8 段階とし、各用量段階ごとに 6 匹のマウ

スを使用し、ザルコーマ180接種後に酵素を投与しなかつた対照群の6匹のマウスと比較した結果を第2表に示す。

第2表

總 群 采 用 量		ザルコーマ 180 細胞平均重 量 (g)	ザルコーマ 180発育 阻 害 度 (パーセン ト)	ザルコーマ 180 完全発育 阻止マウ ス匹数 全マウス 匹数
(units/kg)	(mg/kg)			
0 (対 照)	0	2.8	0	0 / 6
260	8.9	0.2	91	4 / 6
26	0.89	0.6	74	1 / 5 (1匹 死亡)
2.6	0.089	2.0	18	0 / 6

第2表から明らかなように、酵素を260units/kgマウス蛋白量としては8.9g/kgマウス投

特開昭55-34039(4)
与したとき(5回の給用量なので1回には52 units/kgマウス、蛋白量として0.78g/kgマウスの用量)、91%とほとんど完全阻止に近いザルコーマ180発育阻害度を示した。また、酵素を26 units/kgマウス、蛋白量として8.9g/kgマウス投与したとき、ザルコーマ180の発育阻害度は74%であるが、このとき生残っているザルコーマ180の細胞を対照の細胞(酵素不投与のザルコーマ180)と比較して走査型電子顕微鏡でしらべると、対照に比して細胞表面が大きく凹むなど明らかに細胞変形が認められた。このような結果から毒性試験、抗原性試験を経た上で制ガン剤として治療に使用できる可能性があると期待される。

特許出願人

池 澤 宏 郎

代理人

三 宅 宏



手 続 補 正 書 (自発)

昭和53年10月2日

特許庁長官殿

特許庁審査官

殿

1. 事件の表示 昭和53年特許第05575号
2. 発明の名称 バチルス・スリンゲイエンシス菌(Bacillus thuringiensis)のホスファチジルイノシトールホスホリパーゼCの製造法
3. 補正をする者 特許出願人
事件との関係 氏名 池 澤 宏 郎
(名称)
4. 代 理 人 住 所 名古屋市中区東片端町2丁目4番地
(5173) 弁 理 士 三 宅 宏
TEL・ナゴヤ(052)962-7601(代表)・971-9335
5. 拒絶理由通知書の日付 昭和 年 月 日
6. 補正による増加する発明数
7. 補正の対象 明細書の発明の詳細な説明の欄

8. 補正の内容 別紙の通り



1. 明細書中、第5頁第2行目に「リン酸=ナトリウムなどを」とあるを「リン酸二ナトリウムなどを」と補正する。
2. 同じく、第5頁第5行目に「培養、NaCl 0.5%、」とあるを「培養。NaCl 0.5%、」と補正する。
3. 同じく、第5頁第7行目に「培地(PH 6.0)」とあるを「培地(pH 6.0)」と補正する。
4. 同じく、第6頁第1行目に「87℃で」とあるを「87℃で」と補正する。
5. 同じく、第6頁第8行目及び第7頁第1行目に「PH 5.2の」とあるを「pH 5.2の」と補正する。
6. 同じく、第6頁第9行目及び第7頁第10行目に「一夜4℃で、」とあるを「一夜4℃で、」と補正する。
7. 同じく、第6頁第7行目及び第7頁第8行目、第7頁第1行目に「NaCl」とあるを「NaCl」と補正する。
8. 同じく、第7頁第9行目に「PH 7.5の」と

あるを「pH 7.5 の」と補正する。

9. 同じく、第7頁第15行目に「Inc,U.S.A.」
とあるを「Inc., U.S.A. 」と補正する。
10. 同じく、第8頁第2行目に「Acta) 第450
巻、」とあるを「Acta)、第450巻、」と補正
する。
11. 同じく、第11頁第20行目に「マウス蛋白
量としては」とあるを「マウス、蛋白量として
は」と補正する。

以 上